

ISOLASI GEN PALMITOYL-ACP THIOESTERASE PADA KELAPA SAWIT (*Elaies guineensis* Jacq.)

Isolation of Palmitoyl-ACP Thioesterase Gene on Oil Palm (Elaies guineensis Jacq.)

A. Sukariawan¹, A. Purwantoro² dan C. Utomo³

*Program Studi Agronomi
Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada*

ABSTRACT

Plant quality improvement, as a source of oil, was one of the objective of oil palm plant breeding program, such as genetic engineering. Palmitoyl-ACP thioesterase (PAT) gene was an enzyme code, which influenced the synthesis of palmitic acid, where its existence was unexpected in crude palm oil (CPO), due to its negative impact on human health. The first step in genetic engineering was isolating the gene which related to the plant's negative trait. The gene silencing phase was expected to avoid the expression of gene PAT, to reduce the proportion of palmitic acid as well as increasing the content of oleic acid, which was expected to present in CPO.

The aim of the research was to identify nucleotide sequence of the PAT gene of the oil palm. The procedure of the research included, extraction the DNA from leaves, gene isolation through specific primer design and amplification, cloning the PAT gene including ligation and transformation, a series of confirmation and verification, and PAT gene sequencing.

The result showed that 2 fragments of DNA had been isolated by using 2 different pair of primers, they was PAT I and PAT II fragment. PAT I gene fragment was amplified by using PAT II and PAT TF primers. Recombinant plasmid carrying PAT I gene fragment had been produced through cloning, ligation and transformation inside the strain of DH5 α *Escherichia coli*. The targeted fragment inside the plasmid then was sequence and producing 1,063 bp fragment. 750 bp length PAT II gene, was amplified by PAT U and PAT UR primer.

Keywords: *Palmitoyl-ACP thioesterase gene, Elaies guineensis Jacq., isolation cloning, and sequencing.*

1. Lembaga Pendidikan Perkebunan, Medan
2. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
3. Indonesian Oil Palm Research Institute, Medan.

PENGANTAR

Kualitas minyak menjadi salah satu target dalam pemuliaan tanaman kelapa sawit, sasarannya adalah menghasilkan tanaman unggul yang memiliki kandungan *crude palm oil* (CPO) dan asam lemak tak jenuh (ALTJ) tinggi.

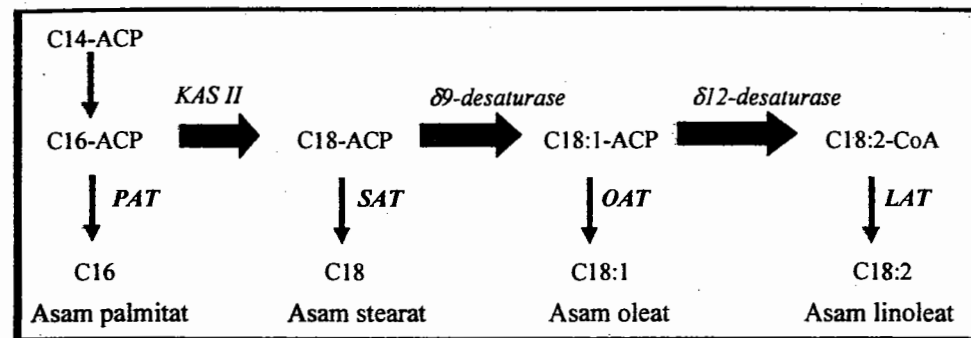
Kelapa sawit komersial *Elaeis guineensis* yang dikenal sebagai tipe tenera (hasil persilangan tipe dura dan pisifera) memiliki keunggulan berupa produktivitas dan kandungan CPO yang tinggi. Namun, komponen penting seperti kandungan ALTJ umumnya rendah (Asmono dkk., 1999). Persilangan konvensional untuk tujuan perbaikan kualitas minyak antara *Elaeis oleifera* dan *Elaeis guineensis* telah dilakukan sejak lama oleh Pusat Penelitian Kelapa Sawit, tetapi lamanya siklus generatif dan terjadinya segregasi dalam persilangan menjadi kendala utama dalam program pemuliaan secara konvensional ini.

Sebagai andalan subsektor perkebunan, kelapa sawit adalah penghasil minyak potensial yang mengandung beberapa jenis asam lemak. Lima asam lemak utama minyak kelapa sawit dan proporsi kandungannya yaitu asam miristat (C14) 1,5-2,5%; asam palmitat (C16) 41-43%; asam stearat (C18) 4-7%; asam oleat (C18:1) 38-40% dan asam linoleat (C18:2) 9-11% (Anonim, 1999). Keberadaan asam lemak jenuh khususnya asam palmitat (C16:0) merupakan hal yang tidak diinginkan bagi kesehatan manusia karena berpotensi meningkatkan kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) darah yang berpotensi meningkatkan resiko kardiovaskular dan penyempitan pembuluh darah. Tingginya kandungan asam palmitat ini menjadi hambatan persaingan dengan minyak nabati yang lain.

Biosintesis asam lemak pada tanaman menurut Corley and Stratford (1998) seperti yang tertera pada gambar 1. menjelaskan bahwa peningkatan asam oleat (sebagai derivat asam lemak yang lebih sehat) dapat dilakukan melalui peningkatan aktivitas KAS-II dan menekan aktivitas palmitoyl ACP-thioesterase (PAT) untuk mengurangi kandungan asam palmitat atau melalui keduanya (Corley and Tinker, 2003).

Selain melalui metode konvensional, rekayasa genetika adalah cara peningkatan kualitas minyak guna mencapai sasaran pemuliaan tanaman kelapa sawit. Sasaran awalnya adalah isolasi gen PAT (palmitoyl-ACP thioesterase), salah satu gen penentu karakter kualitas minyak karena merupakan penyandi enzim yang berperan dalam sintesis asam palmitat. Karakterisasi gen berupa analisis urutan nukleotida penyusun gen tersebut dilakukan sebagai langkah awal program tersebut.

Kloning DNA serta serangkaian konfirmasi dan verifikasi diperlukan untuk membuktikan kebenaran isolasi gen yang dilakukan.



Gambar 1. Alur sintesis asam lemak pada tanaman. Angka di belakang huruf C merupakan jumlah atom karbon dalam asam lemak; KAS-II : 3-keto-acyl-ACP synthetase; ACP : acyl carrier protein; PAT, SAT, OAT dan LAT adalah enzim-enzim yang mengkatalisis masing-masing biosintesis derivat asam lemak

Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh sekuen/urutan gen palmitoyl-ACP thioesterase (PAT) dari tanaman kelapa sawit. Dengan gen tersebut diharapkan dapat melakukan penghambatan ekspresi melalui metode *antisense* (*gene silencing*) dengan harapan terjadi perubahan komposisi asam lemak khususnya peningkatan asam oleat pada tanaman transgenik yang dihasilkan (Corley and Tinker, 2003).

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Ekstraksi dan purifikasi DNA genom

DNA genom kelapa sawit diisolasi menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh Orozco Castillo dkk. (1994) dengan modifikasi berupa penambahan PVPP dan merkaptoetanol sebagai antioksidan dalam buffer ekstraksi. Purifikasi hasil ekstraksi dilakukan menggunakan metode Moller dkk. (Utomo, 2002). Penggabungan (2-3 sampel), purifikasi menggunakan KIAA dan amonium asetat dilakukan melalui sentrifugasi. Penetapan kuantitas dan kualitas dilakukan melalui pengukuran absorbansi dan visualisasi pada gel agarose.

Isolasi gen palmitoyl-ACP thioesterase (PAT)

Langkah pertama yang dilakukan untuk mengisolasi sebuah gen setelah mendapatkan DNA genom adalah merancang primer spesifik.

Disain primer disusun berupa oligonukleotida berdasarkan susunan nukleotida/asam amino yang diambil dari *database* Genbank (NCBI *sequence viewer*) dengan nomor akses AF147879 (1.813 bp) dan AF424808 (1.385 bp). Primer *forward* dirancang berdasar sekuen nukleotida dari *database* genbank, sedangkan primer *reverse* dirancang berupa pasangan (komplemen) nukleotida dengan susunan terbalik. Primer spesifik (*forward* dan *reverse*) inilah yang digunakan untuk mengisolasi gen melalui amplifikasi dengan metode PCR (*polymerase chain reaction*).

Tabel 1. Disain 8 primer guna isolasi gen PAT. Primer *forward* (PAT 1, PAT 1.1, PAT TF, PAT 2.1F, dan PAT U) serta Primer *reverse* (PAT 2, PAT 2.1 dan PAT UR) beserta urutan nukleotida penyusunnya.

Nama Primer	Jenis Primer	Urutan nukleotida
Primer PAT 1	Forward	5' ATC TTT GGT CTT TCA TTC CCC CCT '3
Primer PAT 2	Reverse	5' ACC AAT CAA AAA CTA ATT ATG GTT '3
Primer PAT 1.1	Forward	5' ATG GTT GCT TCG ATT GCC GCT TGC '3
Primer PAT 2.1	Reverse	5' TGC ACT ACC ACC TGG AGT TGG CCC '3
Primer PAT-TF	Forward	5' TTC TAT AAT CAA TTG CCT GAC TGG '3
Primer PAT 2.1F	Forward	5' TGA TCT GGG TTG TCA CCA AAA TGC '3
Primer PAT U	Forward	5' ATG GTN GCT WSG ATH GTN GCT '3
Primer PAT UR	Reverse	5' CAT CCC CCC AGG AAG GAT AGT GCT '3

Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR

Campuran (*mix*) PCR dibuat dalam tabung 0,2 ml berupa 2,5 µl buffer reaksi; 1,0-2,5 µl MgCl₂ 25mM; 2,5 µl dNTP *mix* 10mM; 2,0 µl primer 1 µM; 2,0 µl DNA [50 ng]; *Taq* polymerase 0,2-0,4 µl dan ddH₂O hingga volume 25 µl.

Amplifikasi dilakukan di dalam *GeneAmp PCR*, dengan *setting* program meliputi *heating* 94°C 2 menit; dilanjutkan berturut-turut tahap denaturasi 94°C 1-2 menit; *annealing* 50-60°C (30-60 detik) dan ekstensi 72°C (30-120 detik) sebanyak 25-40 siklus, kemudian ekstensi akhir 72°C selama 5-10 menit dan kondisi akhir (stabil) 4°C.

Purifikasi produk PCR (hasil amplifikasi)

Protokol *QIAquick Purification Kits* (QIAGEN) digunakan untuk purifikasi fragmen DNA hasil PCR guna menghilangkan sisa primer, primer dimer, nukleotida (sisa dNTPs), enzim polymerase dan garam-

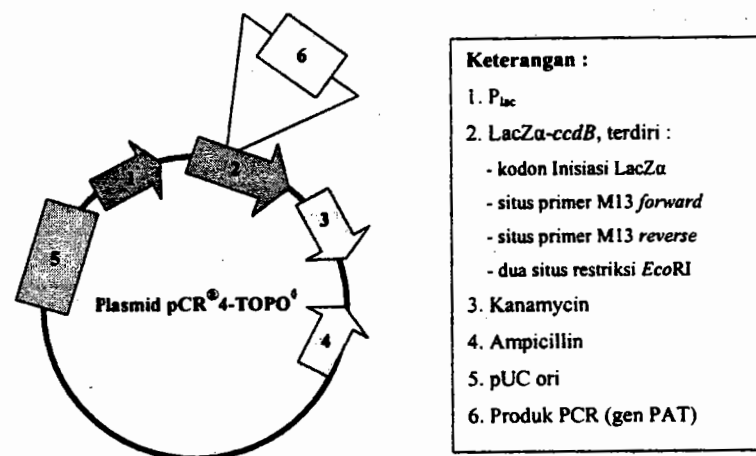
garam dengan menggunakan membran dan sentrifugasi (Anonim, 2002a). Setelah purifikasi, produk PCR siap dikloning setelah terlebih dahulu divisualisasi pada gel agarose.

Kloning gen (DNA target)

Bakteri/prokariot yang digunakan dalam transformasi/kloning adalah *Escherichia coli* strain DH5α yang diperoleh dari BPPT Jakarta. Agen pembuat sel kompeten yang digunakan adalah MgCl₂ 6H₂O 100 mM, CaCl₂ 2H₂O 100 mM dan CaCl₂ 2H₂O 100 mM + 15 % gliserol (Panganiban, 1995). Setelah perlakuan sel kompeten, tabung biakan diinkubasi dalam *freezer* -80°C atau dimasukkan dalam tabung/termos yang berisi nitrogen cair dan bakteri siap ditransformasi.

Setelah diperoleh sel kompeten, selanjutnya melakukan reaksi ligasi untuk membuat plasmid rekombinan. Ligasi (reaksi penggabungan) dilakukan dengan memasukkan 3 µl produk PCR (hasil purifikasi); 1,5 µl larutan garam NaCl₂ dan MgCl₂ dan 0,5 µl vektor pCR4-TOPO (*TOPO cloning kit*) dalam tabung *ependorf* 0,2 ml dan diinkubasi selama 5-30 menit pada suhu ruang. Plasmid ligasi (sirkular) selanjutnya ditransformasi dalam 100 µl bakteri kompeten dengan kejutan panas (*heat shock treatment*) 42°C selama 30-60 detik (Anonim, 2003). Konstruksi plasmid sirkular (hasil reaksi ligasi tersebut) tersaji pada gambar 2.

Konstruksi pCR[®]4-TOPO[®] 3954 bp



Gambar 2. Konstruksi plasmid pCR4-TOPO beserta situs kloning yang terletak pada gen *LacZα-ccdB* yang menjadi lokasi penyisipan gen target (Anonim, 2003)

Pengamatan dan verifikasi bakteri transforman

Bakteri transforman akan tumbuh sebagai koloni dalam media LB Amp sebagai media seleksi. Koloni bakteri diberi tanda/nomor, diverifikasi melalui amplifikasi menggunakan primer M13 *forward* dan *reverse* untuk menentukan bahwa penyisipan gen target ke plasmid telah terjadi.

Verifikasi kebenaran reaksi kloning (ligasi dan transformasi) tersebut dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. Komponen *PCR-mix* terdiri dari 2,5 µl buffer; 1,5 µl MgCl₂; 2,5 µl dNTP; primer (*forward* dan *reverse*) yang digunakan M13F dan M13R masing-masing 0,5 µl. Enzim polymerase yang digunakan adalah *Taq* polymerase (platinum) 0,2 µl dan ditambahkan akuades 15,3 µl. Sampel *positive transformant* (koloni bakteri) diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dimasukkan dalam campuran PCR yang telah disiapkan. *Setting* program PCR diawali dengan *heating* 94°C 2 menit, dilanjutkan 25 siklus tahap denaturasi 94°C 45 detik, *annealing* 60°C 50 detik dan ekstensi 72°C 1 menit, kemudian ekstensi akhir 72°C selama 5 menit dan diakhiri dengan 4°C.

Determinasi, Konfirmasi dan Sekuensing DNA Target

Sel transforman yang telah diverifikasi melalui PCR dan elektroforesis, dari koloninya diinokulasikan menggunakan jarum ose ke dalam 25 ml media LB cair ampisilin, kemudian diinkubasi 37°C selama 18 jam (*over night*), selanjutnya dilakukan pemanenan bakteri untuk diisolasi plasmidnya. Guna mengetahui keberhasilan isolasi plasmid, terlebih dulu divisualisasi pada gel agarose. Konfirmasi dilakukan melalui pemotongan plasmid menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, guna membuktikan telah dihasilkan plasmid yang membawa gen target.

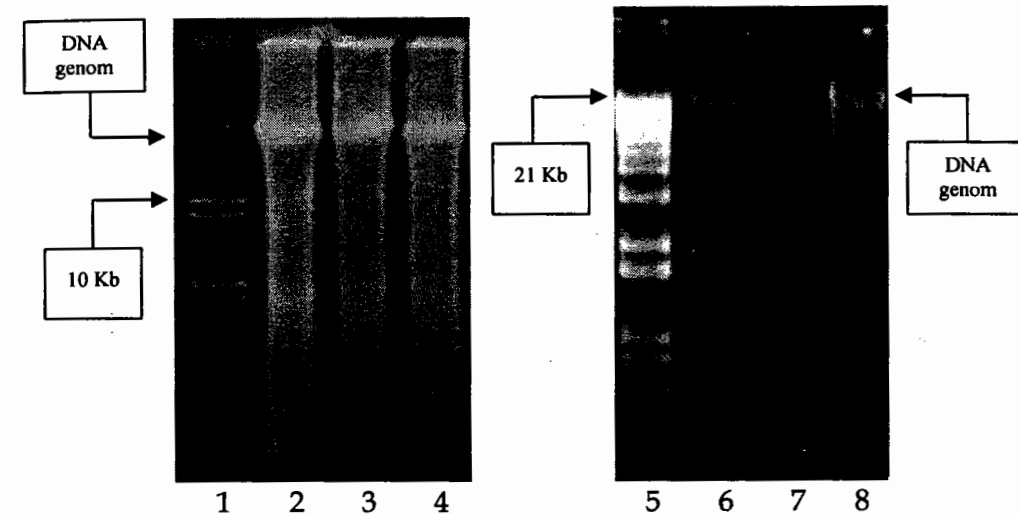
Terdapat 2 situs restriksi *EcoRI* yang terletak di dekat ujung plasmid vektor pCR4-TOPO, hal ini memungkinkan plasmid rekombinan pCR4::PAT dapat terpotong menjadi dua, yaitu vektor (pCR4) dan produk PCR (gen PAT) melalui penambahan enzim *EcoRI* (5-10 unit) dan inkubasi 37°C selama 1 jam.

Plasmid transforman hasil isolasi adalah plasmid sirkular yang mengandung DNA target yaitu gen palmitoyl (PAT). Plasmid ini selanjutnya disekuen guna mengetahui urutan nukleotida fragmen DNA hasil isolasi dengan menggunakan primer universal M13 *forward* dan M13 *reverse*. Urutan nukleotida yang terbaca sebagai hasil sekuensing merupakan nukleotida *forward* dan *reverse*, oleh karena itu sekuen *reverse* harus di-*inverse* dan dibalik susunannya sehingga pembacaan total fragmen dapat dilakukan dari depan (*forward*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan purifikasi DNA genom

Konsentrasi dan kemurnian DNA genom (sebagai *template*) sangat menentukan keberhasilan isolasi yang dilakukan. Dari hasil ekstraksi diperoleh DNA yang masih tinggi tingkat kontaminan berupa senyawa polifenol, protein dan polisakarida dengan indikasi adanya *smear* (bayangan). Kontaminan ini menurut Rogers dan Bendich (1988) akan mempengaruhi keberhasilan isolasi yang dilakukan. Purifikasi yang dilakukan mampu mengurangi kontaminan sehingga kemurnian DNA meningkat. Hasil ekstraksi sebelum dan setelah purifikasi 3 sampel DNA tersaji pada Gambar 3.



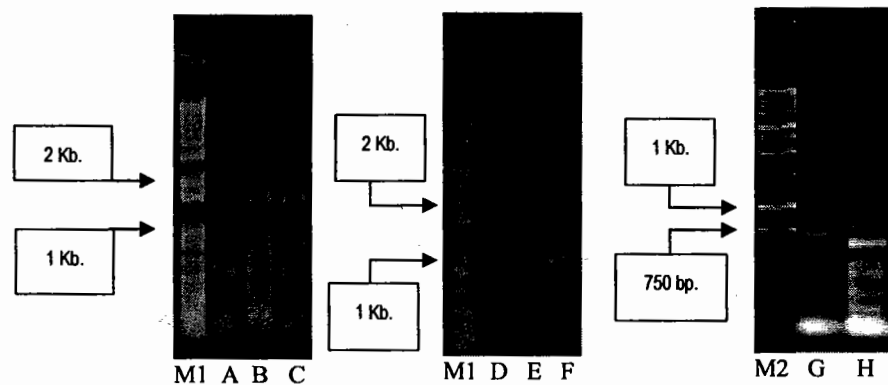
Gambar 3. Visualisasi DNA genom kelapa sawit; lajur 1: 1 Kb Plus DNA ladder, lajur 2-4 adalah 3 sampel DNA sebelum purifikasi; lajur 5 marker λ /*HindIII*; lajur 6-8 adalah sampel DNA sesudah purifikasi

Isolasi Gen Palmitoyl-ACP Thioesterase Berbasis PCR

Kombinasi primer yang dicobakan memberikan hasil berupa fragmen atau *band* yang berbeda seperti tersaji pada Tabel 2 dan Gambar 4. Terdapat dua pasangan primer (F dan G) yang memberikan hasil yang cukup konsisten pada beberapa optimasi PCR berupa fragmen tunggal, yang lain menunjukkan fenomena polimorfis, seperti yang tertera pada Tabel 2 dan Gambar 4 tersebut.

Tabel 2. Kombinasi primer guna isolasi gen PAT dan hasil amplifikasi dengan metode PCR

KOMBINASI	PRIMER (FORWARD DAN REVERSE)	HASIL AMPLIFIKASI
A	PAT 1 dan PAT 2	polimorfis
B	PAT 1.1 dan PAT 2.1	polimorfis
C	PAT TF dan PAT 2.1	polimorfis
D	PAT 1 dan PAT 2.1	polimorfis
E	PAT 1.1 dan PAT 2	polimorfis
F	PAT TF dan PAT 2	band tunggal
G	PAT U dan PAT UR	band tunggal
H	PAT 2.1F dan PAT 2.1	polimorfis

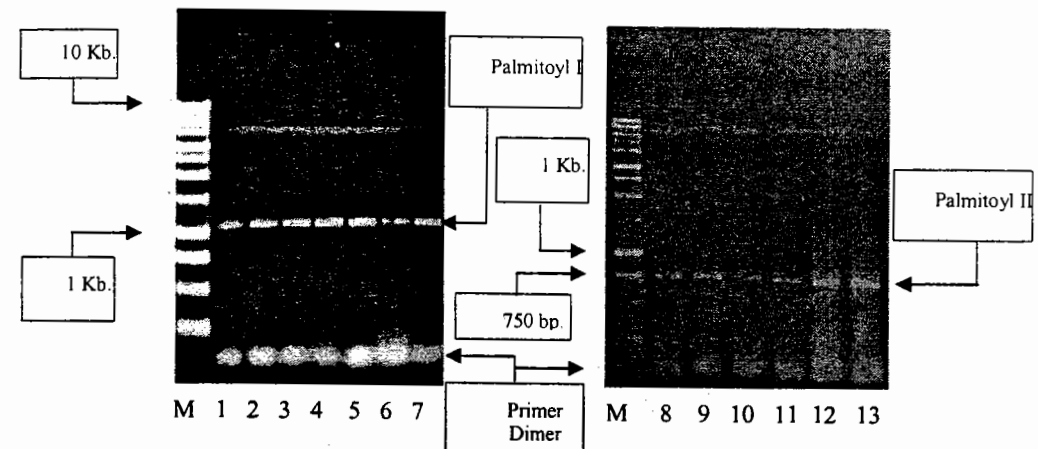


Gambar 4. Visualisasi fragmen DNA hasil amplifikasi beberapa kombinasi primer, M1 : marker λ /HindIII DNA ladder; M2 : 1 Kb. DNA ladder; A, B, C, D, E, F, G dan H : fragmen hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer sesuai Tabel 2

Banyak variabel berpengaruh terhadap keberhasilan dan efektifitas amplifikasi berbasis PCR, termasuk terjadinya fenomena polimorfis. Variabel tersebut menurut Reece (2004) meliputi kesesuaian antar primer (*forward* dan *reverse*), kesesuaian primer dengan *template*, kemampuan *Taq* polymerase dalam sintesis DNA dan kemurnian DNA *template* yang terkait dengan komposisi campuran (*mix*) PCR dan *setting* program PCR yang dicobakan.

Dalam mengamplifikasi fragmen DNA menggunakan PCR, enzim polymerase yang digunakan adalah *Taq* polymerase, enzim tersebut diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* yang tahan dan tetap fungsional terhadap temperatur tinggi. Enzim *Taq* polymerase ini memiliki keistimewaan (spesifikasi) menghasilkan fragmen atau produk amplifikasi dengan *overhang* A pada kedua ujung 3' DNA jalin ganda yang dihasilkan (Reece, 2004).

Melalui optimasi komposisi komponen reaksi dan *setting* program PCR, diperoleh *band* tunggal dengan panjang sekitar 1.100 dan 750 bp tanpa *smear* (bayangan) dan polimorfis. Polimorfis atau munculnya *band* lebih dari satu akan menjadi kompetitor bagi gen target dan mengurangi efisiensi kloning (reaksi ligasi) atau dengan kata lain gen target menjadi tidak spesifik. Untuk memastikan spesifitas gen target, perlu dilakukan purifikasi produk PCR terutama untuk menghilangkan sisa buffer, ion-ion kontaminan serta membuang primer dimer yang terbentuk pada saat reaksi berlangsung.



Gambar 5. Visualisasi fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer PAT TF dan PAT 2 (lajur 1-7); M adalah marker 1 Kb. DNA ladder. Lajur 8-13 menggunakan primer PAT U dan PAT UR; Lajur 8-9 hasil amplifikasi dengan suhu *annealing* 59°C; lajur 10-11 suhu *annealing* 57°C dan lajur 12-13 suhu *annealing* 55°C

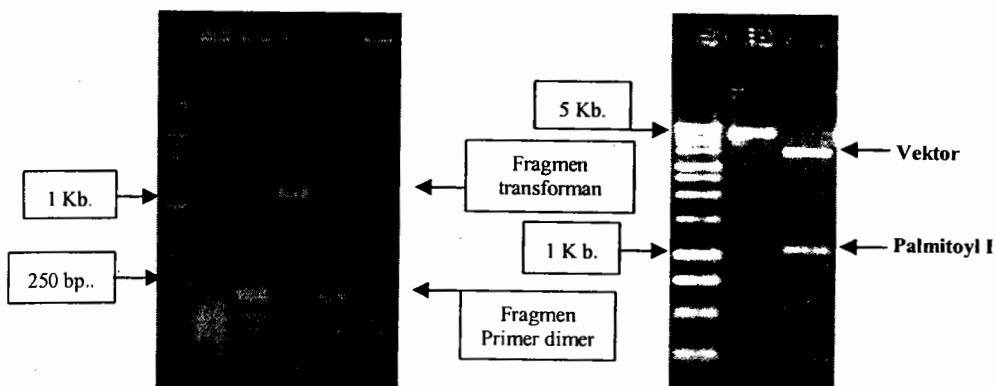
Kloning DNA

Vektor pCR⁴-TOPO dalam reaksi kloning memberikan *overhang* timin (T) pada ujung 3' plasmid linear, sementara *Taq* polymerase

memberikan sebuah adenosin (*overhang A*) pada ujung 3' produk PCR (Anonim, 2003). Vektor TOPO Invitrogen dirancang linier dan diaktivasi dengan enzim topoisomerase I sesuai guna ligasi produk PCR yang diamplifikasi oleh *Taq* polymerase (Reece, 2004).

Melalui reaksi dengan pCR4-TOPO, dapat secara langsung melakukan seleksi rekombinan melalui mekanisme perusakan gen letal *ccdB* yang menyatu (*fusi*) dengan fragmen *lacZα* dalam plasmid vektor. Ligasi PCR produk dalam plasmid merusak ekspresi dari fusi gen *lacZα-ccdB*, sehingga apabila fusi gen tersebut telah tersisipi fragmen, maka sel yang membawa plasmid rekombinan akan tumbuh, karena bakteri telah kehilangan sifat letalnya.

Koloni bakteri yang tumbuh setelah reaksi ligasi dan transformasi dipilih dan diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer M13 *forward* dan *reverse* untuk menentukan bahwa penyisipan gen ke dalam plasmid telah terjadi. Berdasarkan hasil PCR dari 5 sampel bakteri (Gambar 6), ternyata diperoleh satu koloni bakteri rekombinan yang teramplifikasi gen target sekitar 1.100 bp., dua sampel teramplifikasi fragmen sekitar 200 bp (*false positive recombinant*) dan dua sampel lainnya tidak teramplifikasi fragmen spesifik.



Gambar 6. Visualisasi produk PCR dengan sampel bakteri hasil kloning, M: marker 1Kb. DNA ladder, lajur 1-5 sampel produk PCR. Lajur 3 adalah fragmen transforman yang diharapkan, lajur 2 dan 4 adalah fragmen plasmid rekombinan yang berasal dari primer dimer

Gambar 7. Visualisasi plasmid hasil kloning gen palmitoyl, lajur M: marker 1Kb DNA ladder, lajur A adalah plasmid rekombinan sirkular (sekitar 5 Kb.). Lajur B adalah hasil pemotongan plasmid rekombinan 2 µl dengan 2 µl enzim restriksi *EcoRI*

Berdasarkan verifikasi terhadap plasmid rekombinan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* terbukti (melalui visualisasi pada gel) plasmid hasil kloning merupakan plasmid rekombinan yang terbentuk dari ligasi vektor pCR4-TOPO (sekitar 4 Kb.) dan gen target/ gen palmitoyl (sekitar 1.100 bp.). Visualisasi dari pengujian ini tertera pada Gambar 7.

Setelah melalui rangkaian konfirmasi dan verifikasi terhadap plasmid rekombinan yang membawa gen target (palmitoyl I) selanjutnya plasmid ini disekuon untuk mendapatkan urutan nukleotida penyusun gen palmitoyl. Pada fragmen gen palmitoyl II yang teramplifikasi menggunakan primer PAT U dan PAT UR juga diyakini sebagai gen target yang diperoleh sebagai hasil isolasi, meskipun belum diverifikasi. Keyakinan ini didasari oleh konsistensinya yang cukup tinggi pada saat amplifikasi menggunakan mesin PCR.

Setelah dilakukan sekuensing, gen palmitoyl (PAT) I memiliki panjang nukleotida 1.063 bp (48 nukleotida diantaranya adalah sepasang primer yang mengamplifikasinya), sekuon PAT I (*putative*) tersebut tersaji dalam lampiran.

Kesimpulan

1. Terdapat dua pasangan primer dari 8 kombinasi primer yang dicobakan yang mengamplifikasi fragmen tunggal sebesar 1.063 bp dan sekitar 750 bp yang diduga sebagai gen palmitoyl-ACP thioesterase (PAT).
2. Gen PAT (*putative*) terisolasi dan tersekuon dengan panjang fragmen 1.063 bp menggunakan primer PAT TF dan PAT 2.
3. Fragmen sekitar 750 bp hasil amplifikasi primer PAT U dan PAT UR diyakini sebagai gen PAT (parsial) dengan konsistensi yang lebih baik.
4. Melalui kloning dan transformasi dalam *E. coli* DH5α, telah dihasilkan plasmid rekombinan yang membawa fragmen DNA hasil isolasi.
5. Konfirmasi dan verifikasi diperlukan dalam penentuan hasil isolasi gen dan sekuon DNA (gen target).

Saran

1. Perlu penelitian lanjutan guna mendapatkan gen PAT lengkap dan *family gene* penyandi sifat yang berasosiasi dengan kualitas minyak kelapa sawit.
2. Sebelum direkayasa, gen PAT dapat diuji terlebih dahulu pada bakteri apakah ada *gene product* berupa asam palmitat.
3. Perlu analisis lebih jauh strategi atau metode rekayasa genetika yang tepat sebagai upaya menghambat ekspresi gen PAT.
4. Perlu kajian komprehensif dan mendalam kaitan gen yang direkayasa terhadap ekspresi tanaman secara utuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1999. *Studi tentang Perkebunan dan Pemasaran Minyak Kelapa Sawit Indonesia*. PT International Contact Business System Inc. Jakarta.
- Anonim, 2002a. *QIAquick® Spin Handbook for QIAquick PCR Purification Kit*. QIAGEN.
- Anonim, 2002b. Expressions, a newsletter for gene cloning, expression and analysis. *Invitrogen*. Vol. 9 Issue 6 Nov. 2002.
- Anonim, 2003. TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (manual). Invitrogen life technologies. www.invitrogen.com.
- Asmono, D., E. Suprianto, H. Asmady dan M. Kohar. 1999. Kinerja dan Rencana Strategis Pengembangan Bahan Tanaman Kelapa Sawit Dalam Negeri. *Warta PPKS* 7(3):93-108.
- Corley R.H.V. and R. Stratford. 1998. Biotechnology and Oil Palm Opportunities and Future Impact. *Proceeding 1998 International Oil Palm Conference : Comodity of the past, today and the future*. Nusa Dua Bali.
- Corley, R.H.V. and P.B. Tinker. 2003. *The Oil Palm* (4th ed.). Blackwell Science Ltd. Oxford. Pp. 213-215
- Orozco-Castilo, K.J. Chalmers, R. Waugh and W. Powell. 1994. Detection of Genetic Diversity and Selective Gene Introgression in Coffee using RAPD Markers. *Theor. & Applied Genetics*, 87, 934-940.
- Panganiban, G. 1995. Making Competent *E. coli*. [www.protocol-online.org/prot/Molecular_biology/Transformation/Preparation of Compentent Cell](http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_biology/Transformation/Preparation_of_Compentent_Cell).
- Reece, R.J., 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate Chichester Wes Sussex.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of Total Cellular DNA from Plant, Algae, and Fungi. In S.B. Gelvin and R.A. Schilperoot, (eds.). *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- Utomo, C. 2002. Studies on Molecular Diagnosis for Detection, Identification and Differentiation of Ganoderma, the Causal Agent of Basal Stem Rot Disease in Oil Palm. *Doctoral Dissertation*. Cuvellier Verlag Göttingen.